

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



J1040 U.S. PRO
09/905657



07/13/01

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 34 804.1
Anmeldetag: 18. Juli 2000
Anmelder/Inhaber: Bayer Aktiengesellschaft,
Leverkusen/DE
Bezeichnung: Verwendung von VLCFAE zum Identifizieren von
herbizid wirksamen Verbindungen
IPC: C 12 Q, C 12 N, A 01 H

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 26. April 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Faust

Verwendung von VLCFAE zum Identifizieren von herbizid wirksamen Verbindungen

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuren, die für pflanzliche Polypeptide mit der biologischen Aktivität von Very Long Chain Fatty Acid Elongasen kodieren und die Verwendung der davon kodierten Polypeptide zum Identifizieren von neuen, herbizid wirksamen Verbindungen, sowie Verfahren zum Auffinden von Modulatoren dieser Polypeptide.

5 Fettsäure-Elongasen werden auch als 3-Ketoacyl-CoA-Synthasen oder als "condensing enzymes" bezeichnet. Very Long Chain Fatty Acid Elongasen, im weiteren als VLCFAE abgekürzt, sind verantwortlich für die Biosynthese von Fettsäuren mit einer Kettenlänge von mehr als 18 C-Atomen (Millar, A.A. und Kunst, L. 1997, *The Plant Journal* 12(1), 121-131). VLCFAE erkennen als Substrate neben Malonyl-CoA-Ester nur Fettsäure-CoA-Ester mit Kettenlängen größer/gleich C₁₈ (C18+) und sind im Cytoplasma wahrscheinlich mikrosomal assoziierte Proteine. Die *de novo* Fettsäuresynthese bis 18C-Atomen verläuft im Chloroplasten und die Fettsäuren sind dabei mit einem Acyl Carrier Protein (ACP) verestert (WO 15 98/54954). Langkettige Fettsäuren, im weiteren Verlauf als VLCFA bezeichnet, sind Komponenten der Wachsschicht in der Kutikula von Pflanzen. Sie können Komponenten der Zellmembranen sein oder Bestandteile spezieller Speicher-Triacylglyceride. Sie können aber auch Lipide mit Signalfunktion oder mit "second messenger"-Funktion in der Pflanze darstellen, wie z.B. die Sphingolipide. (Millar, A.A. und Kunst, L. 1997, *The Plant Journal* 12(1), 121-131, Millar et al. 2000, *Trends in Plant Science* 5, 95-101).

Aus biochemischen Arbeiten (Matthes et al., *Z. Naturforsch.* 1998, 53c, 1004-1011, Abulnaja und Harwood, *Phytochemistry* 1991, 30(5), 1445-1447) ist bekannt, dass Substanzklassen wie z.B. Chloroacetamide, Oxyacetamide und Thiocarbamate die Synthese langkettiger Fettsäuren hemmen. In diesen Arbeiten ist allerdings nicht gezeigt, ob dies durch direkte Hemmung von bzw. Interaktion mit Fettsäure Elongase

Enzymen geschieht. Ebenso ist unklar, welche der vielen in Pflanzen vorkommenden Elongasen gehemmt werden. Aus biochemischen und zellbiologischen Arbeiten ist ferner bekannt, dass Verbindungen wie BAS 13-338 die Fettsäure-Elongation von C18:1 hemmen (Möller und Albrecht 1994, J. Plant Physiol. 144, 376-384). Auch in
5 dieser Arbeit sind die beteiligten Elongasen unbekannt.

VLCFAE sind pflanzenspezifische Gene, die zum Beispiel in Arabidopsis eine komplexe Genfamilie darstellen. Ein Gen dieser Familie, *fiddlehead*, wird spezifisch in der Epidermis, der äußersten Pflanzenzellenschicht, exprimiert und unterdrückt die Differenzierung dieser Zellen. Mutanten, in denen die Funktion des FIDDLEHEAD-Proteins gestört ist, zeigen Fusionen/Adhäsionen von Blättern und Blütenorganen. Die Fusionen/Adhäsionen der Blütenorgane einer Mutante *fiddlehead* ähneln der Schnecke einer Geige und gaben der Mutante diesen Namen. *Fiddlehead*-Pflanzen zeigen erhebliche morphologische Veränderungen und starke Entwicklungsstörungen. (Lolle et al. 1992, Developmental Biology 152, 383-392, Yephremov et al. 1999, The Plant Cell 11, 2187-2201, Pruitt et al. 2000, PNAS 97(3), 1311-1316). An der Fusion/Adhäsion sind im Wesentlichen Epidermiszellen beteiligt. Dabei fusionieren die Zellen nur über die extrazelluläre Schicht, das Cytoplasma verschmilzt dabei nicht. Da Epidermiszellen für die Bildung der extrazellulären Kutikula verantwortlich sind, ist anzunehmen, dass der Funktionsausfall von *fiddlehead* zu einer Veränderung der VLCFA Komponenten in der Kutikula führt und dies die beschriebenen Organfusionen verursacht.
10
15
20

Die für das Polypeptid FIDDLEHEAD kodierende Nukleinsäure ist unter der Accession Number AJ010713 bzw. O64846 (GenEMBL) zugänglich sowie in WO 98/54954 gezeigt und in der vorliegenden Anmeldung unter SEQ ID NO: 1 beschrieben.
25

Die Vielfalt der Elongasen, ihre Substratspezifität und ihre gewebespezifische Expression ermöglichen Pflanzen die Herstellung von unterschiedlichsten Speicher- und Signallipiden. Diese Synthesevielfalt kann durch heterologe Genexpression in
30

transgenen Pflanzen praktisch genutzt werden. Dabei kann durch Gentransfer die Syntheseleistung, die bedingt ist durch eine Elongase mit spezieller Substratspezifität, von einer Pflanzenart auf eine andere übertragen werden. Andererseits kann auch innerhalb einer Pflanzenart, z.B. durch Austausch der Promotoren, die gewebespezifische Lipidsynthese gezielt verändert werden kann. Solche Arbeiten sind in vielfältiger Weise veröffentlicht. (siehe zum Beispiel WO 96/13582, WO 98/46766, WO 98/54954, WO 95/15387, WO 00/08172).

Überraschenderweise wurde jetzt gefunden, dass mit einem herbiziden Wirkstoff aus der Oxyacetamidklasse, dem Flufenacet, der Phänotyp *fiddlehead* hervorgerufen werden kann. Der Wirkstoff phänokopiert *fiddlehead*. Darüber hinaus führt der Wirkstoff auch zum Fusionieren der Rosettenblätter. Der Phänotyp der Rosettenblattfusion tritt wiederum auch bei anderen Mutanten auf, z.B. bei der *Arabidopsis*-Mutante *lacerata*.

Der Befund, dass das Oxyacetamid Flufenacet die *fiddlehead*-ähnliche Fusion von Blütenorganen hervorruft, führt zur dem Schluss, dass FIDDLEHEAD (FDH), eine Very Long Chain Fatty Acid Elongase, der Interaktionspartner (das Target) des herbiziden Wirkstoffes ist.

Da die VLCFAE, im Besonderen auch FIDDLEHEAD aus *Arabidopsis* und anderen Pflanzen starke Homologien zueinander aufweisen, können auch homologe Polypeptide, die von entsprechenden homologen Nukleinsäuren kodiert werden, sowie weitere Mitglieder der Genfamilie als molekulare Interaktionspartner (Targets) herbizider Wirkstoffe bzw. der vorstehend genannten Stoffklasse verwendet werden. Herbizide Wirkstoffe können also mit verschiedenen VLCFAE interagieren, wobei die Interaktion mit den unterschiedlichen in Pflanzen vorkommenden VLCFAE nicht immer gleich stark sein muss. Dies könnte unter anderem die beobachtete Selektivität der Herbizidklasse erklären. Weitere Mitglieder der Genfamilie, wie Fettsäure-Elongasen bzw. Beta-ketoacyl-CoA Synthasen aus *Arabidopsis*, die zu FIDDLEHEAD (FDH) aus *Arabidopsis thaliana* (Acc. Nr. AJ010713 oder O64846) homolog sind,

sind beispielhaft und nicht abschließend in der nachfolgenden Tabelle sowie in Abb. 1 aufgeführt. Dort ist auch der phylogenetische Verwandtschaftsgrad der gezeigten Gene zueinander qualitativ ablesbar.

	Gen (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Acession Nummer	Beschreibung
1	T1D16.11	trembl AC004484 AC004484_11	putative Beta-ketoacyl-CoA Synthase
2	F18A8.1	trembl AC003105 AC003105_1	putative Beta-ketoacyl-CoA Synthase
3	F16F14.22	trembl AC007047 AC007047_19	putative Beta-ketoacyl-CoA Synthase
4	F20D22.1	trembl AC002411 AC002411_1	putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] Synthase (EC 2.3.1.41)
5	CUT1	trembl AF129511 AF129511_1	"very-long-chain fatty acid condensing enzyme" (CUT1)
6	KCS1	trembl AF053345 AF053345_1	Fettsäureelongase 3-ketoacyl-CoA-Synthase 1-Gen ("KCS1"); KCS1-Produkt: "Fettsäure-Elongase 3-ketoacyl-CoA Synthase 1".
7	AT4g34510	tremblnew AL161585 ATCHRIV81_35	putative Ketoacyl-CoA Synthase
8	T3A4.10	trembl AC005819 AC005819_10	putative Beta-ketoacyl-CoA Synthase
9	AT4g34250	tremblnew AL161585 ATCHRIV81_9	Fettsäure-Elongase-ähnliches Protein
10	AT4g34520 (FAE 1)	tremblnew AL161585 ATCHRIV81_36	Fettsäure-Elongase 1 (FAE 1)
11	F14P13.12	trembl AC009400 AC009400_12	putative Fettsäure-Elongase 3-ketoacyl-CoA Synthase 1
12	F4F15.270	trembl AL049711 ATF4F15_27	Beta-ketoacyl-CoA Synthase-ähnliches Protein
13	T8O18.8	trembl AC007171 AC007171_8	putative Fettsäure-Elongase

In der Publikation von Böger et al. 2000 (Pest Manag. Sci. 56, 497-508) wird geschlossen, dass pflanzliche VLCFAE die primären Targets von Chloroacteamiden sind.

In der vorliegenden Anmeldung wird jedoch zum ersten Mal am Beispiel der VLCFAE FIDDLEHEAD gezeigt, dass VLCFAE Zielproteine (Targets) für herbizide Wirkstoffe sind und zur Identifizierung neuer, verbesserter herbizider Wirkstoffe in dafür geeigneten Verfahren (Assays) eingesetzt werden können.

5

Dies gilt insbesondere für Polypeptide aus Pflanzen, die eine Homologie zum Polypeptid FIDDLEHEAD (FDH) aus Arabidopsis aufweisen, wobei bevorzugt Polypeptide mit einer Homologie von 60 %, besonders bevorzugt von 80 % und ganz besonders bevorzugt von 90 % zu FDH umfasst sind.

10

Besonders bevorzugt sind dabei zu FDH homologe VLCFAE aus Arabidopsis zur Identifizierung neuer, herbizider Wirkstoffe geeignet, wobei bevorzugt Polypeptide mit einer Homologie von 60 %, besonders bevorzugt von 80 % und ganz besonders bevorzugt von 90 % zu FDH umfasst sind.

15

Ganz besonders bevorzugt kann das Polypeptid FDH zur Identifizierung von neuen herbiziden Wirkstoffen verwendet werden

20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb die Verwendung von pflanzlichen Polypeptiden mit der biologischen Aktivität einer VLCFAE zum Identifizieren von Modulatoren der VLCFAE.

25

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls die Verwendung von pflanzlichen Polypeptiden mit der biologischen Aktivität einer VLCFAE, die eine Homologie von 60 %, bevorzugt von 80 % und besonders bevorzugt von 90 % zum Polypeptid FDH aus Arabidopsis aufweisen, zum Identifizieren von Modulatoren der VLCFAE.

30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ebenfalls die Verwendung von Polypeptiden aus Arabidopsis mit der biologischen Aktivität einer VLCFAE, die eine Homologie von 60 %, bevorzugt von 80 % und besonders bevorzugt von 90 % zum

Polypeptid FDH aus Arabidopsis aufweisen, zum Identifizieren von Modulatoren der VLCFAE.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist insbesondere die Verwendung des Polypeptids FIDDLEHEAD gemäß SEQ ID NO: 2 zum Identifizieren von Modulatoren der VLCFAE.

10 Gegenstand der vorliegenden Verwendung ist ebenfalls die Verwendung von für VLCFAE kodierenden Nukleinsäuren zum Identifizieren von Modulatoren der VLCFAE.

15 Gegenstand der vorliegenden Verwendung ist ebenfalls die Verwendung von für VLCFAE kodierenden Nukleinsäuren mit einer Homologie zur Sequenz fiddlehead gemäß der kodierenden Sequenz von SEQ ID NO: 1 von 60 %, bevorzugt von 80 % und besonders bevorzugt von 90 % zum Identifizieren von Modulatoren der VLCFAE. Besonders bevorzugt sind dabei Homologe aus Arabidopsis.

20 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist insbesondere auch die Verwendung der für das Polypeptid FIDDLEHEAD kodierenden Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO: 1 zum Identifizieren von Modulatoren der VLCFAE.

25 Bevorzugt handelt es sich bei den erfindungsgemäß zu verwendenden Polynukleotiden oder Polynukleotid-Fragmenten um solche, die Polynukleotiden aus Pflanzen entsprechen.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei den erfindungsgemäß zu verwendenden Polynukleotiden oder Polynukleotid-Fragmenten um solche, die Polynukleotiden aus Arabidopsis entsprechen.

30 Ganz besonders bevorzugt umfassen die erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide einer Sequenz ausgewählt aus

a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2,

b) Sequenzen, die von einer Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO: 1 kodiert werden,

c) Teilsequenzen der unter a) oder b) definierten Sequenzen, die noch die biologische Aktivität einer VLCFAE besitzen,

d) Sequenzen, welche eine zumindest 60 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität mit den unter a) bis c) definierten Sequenzen aufweisen,

e) Sequenzen, die das C-terminal lokalisierte aktive Zentrum des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 2 umfassen,

f) Sequenzen, welche eine zumindest 60 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität mit den unter e) definierten Sequenzen aufweisen,

g) Sequenzen, die den spezifischen N-Terminus des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 2 umfassen,

h) Sequenzen, welche eine zumindest 60 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität mit den unter g) definierten Sequenzen aufweisen,

Eine ganz besonders bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren stellt ein cDNA-Molekül mit der für FDH kodierenden Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 dar, wobei die unter SEQ ID NO: 1 gezeigten Introns nicht mehr enthalten sind.

Die für FDH kodierenden Bereiche der unter SEQ ID NO: 1 gezeigten Nukleinsäure erstrecken sich von Position 176-583, 1119-1745 und 1821-2438.

Bei den erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren handelt es sich insbesondere um einzelsträngige oder doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder Ribonukleinsäuren (RNA). Bevorzugte Ausführungsformen sind Fragmente genetischer DNA, die wie in SEQ ID NO: 1 gezeigt Introns enthalten können, und cDNAs.

10 Bevorzugt handelt es sich bei den erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren um DNA oder DNA-Fragmente, die genetischer DNA aus Pflanzen entsprechen.

15 Besonders bevorzugt handelt es sich bei den erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren um DNA oder DNA-Fragmente, die genetischer DNA von *Arabidopsis* entsprechen.

Ganz besonders bevorzugt umfassen die erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren eine Sequenz ausgewählt aus

20 a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,

b) Sequenzen, die für ein Polypeptid codieren, welches die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst,

25 c) zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter a) oder b) definierten Sequenzen,

d) Sequenzen, welche an die unter a) oder b) definierten Sequenzen hybridisieren,

e) Sequenzen, welche eine zumindest 60 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität mit den unter a) oder b) definierten Sequenzen aufweisen,

5 f) Sequenzen, welche für das C-terminal lokalisierte aktive Zentrum des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 2 kodieren

10 g) Sequenzen, welche eine zumindest 60 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität mit den unter f) definierten Sequenzen aufweisen,

h) Sequenzen, welche für den spezifischen N-Terminus des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 2 kodieren,

15 i) Sequenzen, welche eine zumindest 60 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität mit den unter h) definierten Sequenzen aufweisen,

20 j) Sequenzen, welche zu den unter a) bis h) definierten Sequenzen komplementär sind, und

25 k) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz codieren wie die unter a) bis h) definierten Sequenzen.

Eine ganz besonders bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren stellt ein cDNA-Molekül mit der für FDH kodierenden Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 dar.

30 Der Ausdruck "hybridisieren", wie er hierin verwendet wird, beschreibt den Vorgang, bei welchem ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül mit einem

komplementären Strang eine Basenpaarung eingeht. Auf diese Weise können ausgehend von der hierin offenbarten Sequenzinformation beispielsweise DNA-Fragmente aus anderen Pflanzen als Arabidopsis isoliert werden, welche für VLCFAE und insbesondere für FIDDLEHEAD kodieren, welche dieselben oder ähnliche Eigenschaften einer Elongase mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 aufweisen. So kann zum Beispiel die Nukleinsäuresequenz kodierend für die N-terminale, für FDH charakteristische Polypeptidsequenz verwendet werden, um dem FDH sequenziell und funktionell homologe, zum Identifizieren von neuen herbiziden Wirkstoffen geeignete Nukleinsäuresequenzen bzw. Polypeptide zu finden.

10

Hybridisierungsbedingungen werden nach folgender Formel näherungsweise berechnet:

15

Die Schmelztemperatur $T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \log\{c(\text{Na}^+)\] + 0,41(\% \text{G} + \text{C}) - 500/n$ (Lottspeich und Zorbas, 1998).

20

Dabei ist c die Konzentration und n die Länge des hybridisierenden Sequenzabschnitts in Basenpaaren. Für eine Sequenz >100 bp entfällt der Ausdruck 500/n. Mit höchster Stringenz wird bei einer Temperatur 5-15°C unterhalb Tm und einer Ionenstärke von 15 mM Na⁺ (entspricht 0.1 x SSC) gewaschen. Wird eine RNA-Probe zur Hybridisierung verwendet, so ist der Schmelzpunkt um 10-15°C höher.

25

Bevorzugte Hybridisierungsbedingungen sind nachstehend angegeben:

Hybridisierungslösung: DIG Easy Hyb (Fa.: Roche) Hybridisierungstemperatur: 37°C, bevorzugt 42°C (DNA-DNA), 50°C (DNA-RNA).

1. Waschschrift: 2X SSC, 0,1 % SDS 2x5 min bei Raumtemperatur;

2. Waschschritt: 1X SSC, 0,1 % SDS 2x 15 min bei 50°C; bevorzugt 0,5X SSC, 0,1 % SDS 2x 15 min bei 65°C; besonders bevorzugt 0,2X SSC, 2x15min bei 68°C.

5 Der Ausdruck "aktives Zentrum" bezieht sich auf eine Peptidregion, die funktionell der Peptidregion mit einer Aminosäuresequenz von Position 191 bis Position 310 der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 entspricht. Die reaktive Aminosäure Cystein befindet sich an Position 257.

10 Der Grad der Identität der Nukleinsäuren wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms NCBI BLASTN Version 2.0.4. (Altschul et al., 1997).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung der regulatorischen Regionen, welche natürlicherweise in Pflanzenzellen, insbesondere in Arabidopsis,
15 die Transkription der erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren kontrollieren, in Verfahren zum Identifizieren von Inhibitoren der VLCFAE.

Der Ausdruck "regulatorische Regionen", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf nicht-translatierte Regionen des betreffenden Gens, wie Promotoren, Enhancer, Repressor- oder Aktivator-Bindungsstellen oder Terminationssequenzen, die mit zellulären Proteinen interagieren, wodurch die Transkription gesteuert wird.
20

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiterhin die Verwendung von DNA-Konstrukten, die eine erfindungsgemäß zu verwendende Nukleinsäure und einen heterologen Promotor umfassen, zum Identifizieren von Modulatoren der VLCFAE.
25

Der Ausdruck "heterologer Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen Promotor, der andere Eigenschaften als derjenige Promotor aufweist, der im Ursprungsorganismus die Expression des betreffenden Gens kontrolliert.

Die Auswahl von heterologen Promotoren ist davon abhängig, ob zur Expression pro- oder eukaryotische Zellen oder zellfreie Systeme verwendet werden. Beispiele für heterologe Promotoren sind der 35S Promoter des Blumenkohlmosaikvirus für pflanzliche Zellen, der Promoter der Alkoholdehydrogenase für Hefezellen, die T3-,
5 T7- oder SP6-Promotoren für prokaryotische Zellen oder zellfreie Systeme, sowie gewebespezifische Promotoren aus Pflanzen, z.B. der epidermisspezifische Promotor von FIDDLEHEAD und die Promotoren anderer gewebespezifischer Elongasen

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung von Vektoren, die eine erfindungsgemäß zu verwendende Nukleinsäure, eine erfindungsgemäß zu verwendende regulatorische Region oder ein erfindungsgemäß zu verwendendes DNA-Konstrukt enthalten, in Verfahren zum Identifizieren von Modulatoren der VLCFAE.

15 Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete Phagen, Plasmide, Phagmide, Phasmide, Cosmide, YACs, BACs, künstliche Chromosomen oder Partikel, die für einen Partikelbeschuss geeignet sind, verwendet werden.

20 Bevorzugte Vektoren sind pBIN (Bevan, 1984) und seine Derivate für pflanzliche Zellen, pFL61 (Minet et al., 1992) oder z.B. die p4XXprom. Vektorsserie (Mumberg D., Müller R. und Funk M. 1995, Gene 156, 119-122) für Hefezellen, pBLUESCRIPT-Vektoren für bakterielle Zellen, lamdaZAP (Fa. Stratagene) für Phagen.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung von Wirtszellen, die eine erfindungsgemäß zu verwendende Nukleinsäure, ein erfindungsgemäß zu verwendendes DNA-Konstrukt oder einen erfindungsgemäß zu verwendenden Vektor enthalten, zum Identifizieren von Modulatoren der VLCFAE.

Der Ausdruck "Wirtszelle", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf Zellen, die natürlicherweise die erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren nicht enthalten.

5 Als Wirtszellen eignen sich sowohl prokaryotische Zellen, vorzugsweise *E. coli*, als auch eukaryotische Zellen, wie Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, Insekten, Pflanzen, Froschrohzyten und Zelllinien von Säugern.

Der Ausdruck "Polypeptide", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich sowohl auf
10 kurze Aminosäureketten, die gewöhnlich als Peptide, Oligopeptide oder Oligomere bezeichnet werden, als auch auf längere Aminosäureketten, die gewöhnlich als Proteine bezeichnet werden. Er umfasst Aminosäureketten, die entweder durch natürliche Prozesse, wie posttranskriptionale Prozessierung, oder durch chemische Verfahren, die Stand der Technik sind, modifiziert sein können. Solche Modifikationen
15 können an verschiedenen Stellen und mehrfach in einem Polypeptid vorkommen, wie beispielsweise an dem Peptid-Rückgrat, an der Aminosäure-Seitenkette, am Amino- und/oder am Carboxy-Terminus. Sie umfassen beispielsweise Acetylierungen, Acylierungen, ADP-Ribosylierungen, Amidierungen, kovalente Verknüpfungen mit Flavinen, Häm-Anteilen, Nukleotiden oder Nukleotid-Derivaten, Lipiden oder Lipid-Derivaten oder Phosphatidylinositol, Cyclisierungen, Disulfidbrückenbildung, Demethylierungen, Cystin-Bildungen, Formylierungen, gamma-Carboxylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Iodierungen, Methylierungen, Myristoylierungen, Oxidationen, proteolytische Prozessierungen, Phosphorylierungen, Selenoylierungen und tRNA-vermittelte Additionen von Aminosäuren.
20

25 Die erfindungsgemäßen Polypeptide können in der Form "reifer" Proteine oder als Teile größerer Proteine, z.B. als Fusionsproteine, vorliegen. Weiterhin können sie Sezernierungs- oder "Leader"-Sequenzen, Pro-Sequenzen, Sequenzen, die eine einfache Reinigung ermöglichen, wie mehrfache Histidin-Reste, oder zusätzliche stabilisierende Aminosäuren aufweisen.
30

Die erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide müssen nicht vollständige VLCFAE darstellen, sondern können auch nur Fragmente davon sein, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität der vollständigen VLCFAE aufweisen. Polypeptide, die eine gleichartige biologische Aktivität wie eine VLCFAE mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 ausüben, werden noch als erfindungsgemäß betrachtet. Dabei müssen die erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide nicht den VLCFAE aus *Arabidopsis* entsprechen. Als erfindungsgemäß zu verwendende Polypeptide werden auch Polypeptide betrachtet, die zu VLCFAE beispielsweise der folgenden Pflanzen oder zu Fragmenten davon, die noch die biologische Aktivität dieser ausüben können, homolog sind:

Dikotyle Unkräuter der Gattungen: *Abutilon*, *Amaranthus*, *Ambrosia*, *Anoda*, *Anthemis*, *Aphanes*, *Atriplex*, *Bellis*, *Bidens*, *Capsella*, *Carduus*, *Cassia*, *Centaurea*, *Chenopodium*, *Cirsium*, *Convolvulus*, *Datura*, *Desmodium*, *Emex*, *Erysimum*,
15 *Euphorbia*, *Galeopsis*, *Galinsoga*, *Galium*, *Hibiscus*, *Ipomoea*, *Kochia*, *Lamium*,
Lepidium, *Lindernia*, *Matricaria*, *Mentha*, *Mercurialis*, *Mullugo*, *Myosotis*, *Papaver*,
Pharbitis, *Plantago*, *Polygonum*, *Portulaca*, *Ranunculus*, *Raphanus*, *Rorippa*, *Rotala*,
Rumex, *Salsola*, *Senecio*, *Sesbania*, *Sida*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sonchus*, *Sphenoclea*,
Stellaria, *Taraxacum*, *Thlaspi*, *Trifolium*, *Urtica*, *Veronica*, *Viola*, *Xanthium*.

20

Dikotyle Kulturen der Gattungen: *Arachis*, *Beta*, *Brassica*, *Cucumis*, *Cucurbita*,
Helianthus, *Daucus*, *Glycine*, *Gossypium*, *Ipomoea*, *Lactuca*, *Linum*, *Lycopersicon*,
Nicotiana, *Phaseolus*, *Pisum*, *Solanum*, *Vicia*.

25

Monokotyle Unkräuter der Gattungen: *Aegilops*, *Agropyron*, *Agrostis*, *Alopecurus*,
Apera, *Avena*, *Brachiaria*, *Bromus*, *Cenchrus*, *Commelina*, *Cynodon*, *Cyperus*,
Dactyloctenium, *Digitaria*, *Echinochloa*, *Eleocharis*, *Eleusine*, *Eragrostis*, *Eriochloa*,
Festuca, *Fimbristylis*, *Heteranthera*, *Imperata*, *Ischaemum*, *Leptochloa*, *Lolium*,
Monochoria, *Panicum*, *Paspalum*, *Phalaris*, *Phleum*, *Poa*, *Rottboellia*, *Sagittaria*,
30 *Scirpus*, *Setaria*, *Sorghum*.

Monokotyle Kulturen der Gattungen: Allium, Ananas, Asparagus, Avena, Hordeum, Oryza, Panicum, Saccharum, Secale, Sorghum, Triticale, Triticum, Zea.

Die erfundungsgemäß zu verwendenden Polypeptide können im Vergleich zu der entsprechenden Region von natürlich vorkommenden VLCFAE Deletionen oder Aminosäuresubstitutionen aufweisen, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität der vollständigen Fettsäure-Elongasen ausüben. Konservative Substitutionen sind bevorzugt. Solche konservativen Substitutionen umfassen Variationen, wobei eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure aus der folgenden Gruppe 5
ersetzt wird:

10

1. Kleine aliphatische, nicht-polare oder wenig polare Reste: Ala, Ser, Thr, Pro und Gly;
2. Polare, negativ geladene Reste und deren Amide: Asp, Asn, Glu und Gln;
- 15 3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg und Lys;
4. Große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val und Cys; und
5. Aromatische Reste: Phe, Tyr und Trp.

Die folgende Liste zeigt bevorzugte konservative Substitutionen:

20

Ursprünglicher Rest	Substitution
Ala	Gly, Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala, Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val

Ursprünglicher Rest	Substitution
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Tyr, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit auch die Verwendung von Polypeptiden, welche zumindest eine biologische Aktivität einer VLCFAE ausüben und eine Aminosäuresequenz umfassen, die eine zumindest 60 %ige Identität, vorzugsweise 80 %ige Identität, besonders bevorzugt 90 %ige Identität und ganz besonders bevorzugt 97-99 %ige Identität mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2 über deren Gesamtlänge aufweisen.

Der Grad der Identität der Aminosäuresequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms BLASTP + BEAUTY Version 2.0 4. (Altschul et al., 1997).

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide ist die VLCFAE FIDDLEHEAD (FDH) mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2.

Die FDH-Aminosäuresequenz gehört aufgrund ihrer Homologie (Yephremov et al. 1999) zu der Familie der "Fatty Acid Elongasen" (FAE). Das FDH-Protein besitzt im Bereich der Aminosäuren von ca. 53 bis 75 und im Bereich ca. 93 bis 115 zwei potentielle Transmembran-Domänen.

Die ersten 45-50 Aminosäuren am N-Terminus sind spezifisch für das FIDDLEHEAD Protein, dessen biologische Bedeutung bislang unklar ist.

5 Der N-Terminus ist so spezifisch, dass er als Erkennungssequenz für FDH dienen kann.

Der Ausdruck "biologische Aktivität einer VLCFAE, wie er hierin verwendet wird, bedeutet die Fähigkeit der Biosynthese von Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 18 und mehr C-Atomen sowie das Erkennen der Substrate Malonyl-CoA Ester und/oder Fettsäure-CoA Ester mit Kettenlängen größer/gleich C₁₈.

10 Die erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren können auf die übliche Weise hergestellt werden. Beispielsweise können die Nukleinsäuremoleküle vollständig chemisch synthetisiert werden. Man kann auch kurze Stücke der erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren chemisch synthetisieren und solche Oligonukleotide radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren. Die markierten Oligonukleotide können auch verwendet werden, um ausgehend von Pflanzen-mRNA hergestellte cDNA-Banken zu durchsuchen. Klone, an die die markierten Oligonukleotide hybridisieren, werden zur Isolierung der betreffenden DNA-Fragmente ausgewählt. Nach der Charakterisierung der isolierten DNA erhält man auf einfache Weise die erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren.

15 20 25 Die erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren können auch mittels PCR-Verfahren unter Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide hergestellt werden.

Der Ausdruck "Oligonukleotid(e)", wie er hierin verwendet wird, bedeutet DNA-Moleküle, die aus 10 bis 50 Nukleotiden, vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotiden, bestehen. Sie werden chemisch synthetisiert und können als Sonden verwendet werden.

Zur Herstellung der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide, die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodiert werden, können Wirtszellen, die erfindungsgemäß zu verwendende Nukleinsäuren enthalten, unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden. Die gewünschten Polypeptide können danach auf übliche Weise aus den Zellen oder dem Kulturmedium isoliert werden. Die Polypeptide können auch in *in-vitro*-Systemen hergestellt werden.

Ein schnelles Verfahren zum Isolieren der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide, die von Wirtszellen unter Verwendung einer erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäure synthetisiert werden, beginnt mit der Expression eines Fusionsproteins, wobei der Fusionspartner auf einfache Weise affinitätsgereinigt werden kann. Der Fusionspartner kann beispielsweise Glutathion S-Transferase sein. Das Fusionsprotein kann dann an einer Glutathion-Affinitätssäule gereinigt werden. Der Fusionspartner kann durch partielle proteolytische Spaltung beispielsweise an Linkern zwischen dem Fusionspartner und dem zu reinigenden erfindungsgemäßen Polypeptid abgetrennt werden. Der Linker kann so gestaltet werden, dass er Ziel-Aminosäuren, wie Arginin- und Lysin-Reste einschließt, die Stellen für eine Spaltung durch Trypsin definieren. Um solche Linker zu erzeugen, können Standard-Klonierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden angewendet werden.

Weitere mögliche Reinigungsverfahren basieren auf präparativer Elektrophorese, FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht hydrophoben Säulen), Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-Chromatographie und Affinitätschromatographie.

Da VLCFAE Membranproteine bzw. membranassoziierte Proteine darstellen, werden in den Reinigungsverfahren vorzugsweise Detergensextraktionen durchgeführt, beispielsweise unter Verwendung von Detergenzien, die die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Polypeptide nicht oder nur wenig beeinflussen, wie nicht-ionische Detergenzien.

Die Reinigung der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide kann die Isolierung von Membranen ausgehend von Wirtszellen, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren exprimieren, umfassen. Vorzugsweise exprimieren solche Zellen die erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide in einer ausreichenden Kopienanzahl, so dass die Menge der Polypeptide in einer Membranfraktion mindestens 10-fach höher ist als diejenige, die in vergleichbaren Membranen von Zellen gefunden wird, die das FDH-Gen natürlicherweise exprimieren; besonders bevorzugt ist die Menge mindestens 100-fach, ganz besonders bevorzugt mindestens 1000-fach höher.

5

10 Für Testzwecke kann auch ohne eine besondere Reinigung eine Membranfraktion, insbesondere eine Mikrosomenfraktion angereichert und verwendet werden.

Die Ausdrücke "Isolierung oder Reinigung", wie sie hierin verwendet werden, bedeuten, dass die erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide von anderen Proteinen oder anderen Makromolekülen der Zelle oder des Gewebes abgetrennt werden. Vorzugsweise ist eine die erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide enthaltende Zusammensetzung hinsichtlich des Proteingehalts gegenüber einer Präparation aus den Wirtszellen mindestens 10-fach und besonders bevorzugt mindestens 100-fach angereichert.

15

20 Die erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide können auch ohne Fusionspartner mit Hilfe von Antikörpern, die an die Polypeptide binden, affinitätsgereinigt werden.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Verfahren zum Auffinden von chemischen Verbindungen, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden und deren Eigenschaften verändern. Aufgrund der vielfältigen Funktionen der erfindungsgemäßen VLCFAE, können Modulatoren, die die Aktivität beeinflussen, neue wuchsregulierende oder herbizide Wirkstoffe darstellen. Modulatoren können

30 Agonisten oder Antagonisten bzw. Inhibitoren oder Aktivatoren sein.

Der Ausdruck "Agonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das die Aktivität der VLCFAE beschleunigt oder verstärkt.

5 Der Ausdruck "Antagonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das die Aktivität der VLCFAE verlangsamt oder verhindert.

10 Der Ausdruck "Modulator", wie er hierin verwendet wird, stellt den Oberbegriff zu Agonist bzw. Antagonist dar. Modulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden. Weiterhin können Modulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, und dadurch deren biologische Aktivität beeinflusst. Modulatoren können natürliche Substrate und Liganden darstellen oder strukturelle oder funktionelle Mimetika davon.

15 Vorzugsweise handelt es sich bei den Modulatoren um kleine organisch-chemische Verbindungen.

20 Die Bindung der Modulatoren an die VLCFAE kann die zellulären Vorgänge auf eine Weise verändern, die zum Absterben der damit behandelten Pflanzen führt.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind deshalb auch Modulatoren von VLCFAE, die mit Hilfe eines vorstehend beschriebenen Verfahrens zum Identifizieren von Modulatoren des FDH-Proteins oder einer dazu homologen VLCFAE gefunden wurden

30 Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung Verfahren zum Auffinden von chemischen Verbindungen, welche die Expression der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide verändern. Auch solche "Expressionsmodulatoren" können neue wuchsregulierende oder herbizide Wirkstoffe darstellen. Expressionsmodu-

die an die regulatorischen Regionen der für die erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide codierenden Nukleinsäuren binden. Weiterhin können Expressionsmodulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an regulatorische Regionen der für die erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide kodierenden Nukleinsäuren bindet, und dadurch deren Expression beeinflusst. Expressionsmodulatoren können auch Antisense-Moleküle sein.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich ebenfalls auf die Verwendung von Modulatoren der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide oder von Expressionsmodulatoren als Pflanzenwuchsregulatoren oder Herbizide.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls Expressionsmodulatoren von VLCFAE, die mit Hilfe des vorstehend beschriebenen Verfahrens zum Auffinden von Expressionsmodulatoren gefunden werden.

Die erfindungsgemäßen Verfahren schließen Hochdurchsatz-Screening (high throughput screening; HTS) ein. Dafür können sowohl Wirtszellen als auch zellfreie Präparationen verwendet werden, die die erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren und/oder die erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide enthalten.

Um Modulatoren aufzufinden, kann ein synthetischer Reaktionsmix (z.B. Produkte der *in vitro*-Transkription) oder ein zellulärer Bestandteil, wie eine Membran oder irgendeine andere Präparation, die die erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide enthält, zusammen mit einem markierten Substrat oder Liganden der Polypeptide in Gegenwart und Abwesenheit eines Kandidatenmoleküls, das ein Agonist oder Antagonist sein kann, inkubiert werden. Die Fähigkeit des Kandidatenmoleküls die Aktivität der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide zu erhöhen oder zu hemmen, wird erkennbar an einer erhöhten oder verringerten Bindung des markierten Liganden oder an einer erhöhten oder verringerten Umsetzung des markierten Sub-

strates. Moleküle, die gut binden und zu einer erhöhten Aktivität der erfindungsgemäß Polypeptide führen, sind Agonisten. Moleküle, die gut binden, und die biologische Aktivität der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide hemmen, sind gute Antagonisten. Es kann sich dabei um Hemmstoffe der oben genannten herbiziden Stoffklassen handeln, ohne auf diese beschränkt zu sein.

5 Die Detektion der biologischen Aktivität der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide kann durch ein so genanntes Reportersystem verbessert werden. Reportersysteme in dieser Hinsicht umfassen, sind aber nicht beschränkt auf colorimetrisch markierte Substrate, die in ein Produkt umgewandelt werden oder ein Reportergen, das auf Veränderungen der Aktivität oder der Expression der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide anspricht oder andere bekannte Bindungstests.

10 15 Die Aktivität membranassozierter Proteine kann auf eine weitere Weise vorteilhaft gemessen werden. Die funktionelle heterologe Expression solcher Proteine in *E. coli* ist oft schwierig oder unmöglich. In diesem Fall kann durch geeignete Klonierung (z.B. unter Nutzung geeigneter PCR Strategien) der katalytisch aktive Teil des Proteins vom membranständigen Teil des Proteins getrennt werden, sodass das Genprodukt ein lösliches Protein darstellt und leicht gereinigt werden kann. Zur Messung der Aktivität löslicher Proteine steht ein breites Repertoire von Meßmöglichkeiten zur Verfügung. Eine besonders empfindliche Messung kann z.B. unter Einsatz eines fluoreszenzmarkierten Liganden oder Substrates mittels Fluoreszenzpolarisation erfolgen.

20 25 Ein weiteres Beispiel für ein Verfahren, mit welchem Modulatoren der erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide aufgefunden werden können, ist ein Verdrängungstest, bei dem man unter dafür geeigneten Bedingungen die erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide und einen potenziellen Modulator mit einem Molekül, das bekanntermaßen an die erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide bindet, wie einem natürlichen Substrat oder Liganden oder einem

Substrat- oder Liganden-Mimetikum zusammenbringt. Die erfindungsgemäß zu verwendenden Polypeptide selbst können markiert werden, z.B. radioaktiv oder colorimetrisch, so dass man die Anzahl der Polypeptide, die an einen Liganden gebunden sind oder die eine Umsetzung mitgemacht haben, exakt bestimmen kann. Auf 5 diese Weise lässt sich die Effektivität eines Agonisten oder Antagonisten ermessen.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung einer erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäure, eines erfindungsgemäß zu verwendenden DNA-Konstrukts oder eines erfindungsgemäß zu verwendenden Vektors zum Herstellen von transgenen Pflanzen, sowie die entsprechenden transgenen Pflanzen als solche bzw. deren Teile oder Vermehrungsmaterial. 10

Transgene Pflanzen, Pflanzenteile, Protoplasten, Pflanzengewebe oder Pflanzenvermehrungsmaterialien, in denen nach Einbringen einer erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäure, eines erfindungsgemäß zu verwendenden DNA-Konstrukts oder eines erfindungsgemäß zu verwendenden Vektors die intrazelluläre Konzentration der VLCFAE im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypformen erhöht oder vermindert zu verwendenden, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. 15

Der Ausdruck "Pflanzenteile", wie er hierin verwendet wird, bedeutet alle oberirdischen und unterirdischen Teile und Organe der Pflanzen, wie Spross, Blatt, Blüte und Wurzel, sowie daraus hergestellte Protoplasten und Gewebekulturen. 20

Der Ausdruck "Vermehrungsmaterial", wie er hierin verwendet wird, bedeutet vegetatives und generatives Vermehrungsmaterial, wie Stecklinge, Knollen, Rhizome, Ableger und Samen. 25

Gegenstand der Erfindung sind auch Pflanzen, in denen Veränderungen an der für VLCFAE kodierenden Sequenz vorgenommen und selektioniert werden, die zur Herstellung einer VLCFAE führen oder in denen durch Mutagenese eine Erhöhung oder 30

Verminderung der biologischen Aktivität oder der Menge der in den Pflanzen vorliegenden VLCFAE erreicht wird.

Der Ausdruck "Mutagenese" wie er hierin verwendet wird, bezeichnet eine Methode zur Erhöhung der spontanen Mutationsrate und damit zur Isolierung von Mutanten. Dabei können Mutanten mit Hilfe von Mutagenen *in vivo* erzeugt werden, z. B. mit chemischen Verbindungen oder physikalischen Einflüssen, die geeignet sind, Mutationen auszulösen (z. B. Basenanaloga, interkalierende Stoffe, UV-Strahlen etc.). Die gewünschten Mutanten können durch Selektion auf einen bestimmten Phänotyp hin erhalten werden. Die Position der Mutationen auf den Chromosomen kann relativ zu anderen, bekannten Mutationen durch Komplementation- und Rekombinationsanalysen bestimmt werden. Mutationen können auch gezielt in chromosomal oder extrachromosomal DNA eingebracht werden (*in vitro*-Mutagenese, site-directed-Mutagenese, error prone-PCR etc.).

Der Ausdruck "Mutante", wie er hierin verwendet wird, bezeichnete einen Organismus, der ein verändertes (mutiertes) Gen trägt. Eine Mutante ist definiert durch den Vergleich mit dem Wildtyp, der das unveränderte Gen trägt.

Da die erfundungsgemäß zu verwendenden VLCFAE, insbesondere das Protein FDH, eine Rolle in den Signal- und Entwicklungsvorgängen spielt, erhält man in transgenen "sense" Pflanzen oder in Pflanzen, die auf eine erhöhte Menge oder Aktivität entsprechender endogener VLCFAE oder in der Signaltransduktion damit verknüpfter Elemente gezielt selektiert wurden, eine erhöhte Resistenz gegenüber herbizid wirkenden Verbindungen. Auch durch Mutation der Aminosäuresequenz können VLCFAE entwickelt werden, die gegenüber auf diese Proteine herbizid wirkende Verbindungen resistent sind. Überträgt und exprimiert man die Gene solcher natürlich isolierten oder synthetisch hergestellten Mutanten auf Pflanzen, insbesondere auf Kulturpflanzen wie z.B. Mais, Weizen, Gerste, Hafer, Reis, Roggen, Tomaten, Leguminosen, Kartoffelpflanzen, *Lactuca sativa*, Brassicaceen, Holzge-

wächse, *Physcomitrella patens*, so sind diese herbizidresistent oder durch eine erhöhte Toleranz gegenüber Herbiziden gekennzeichnet.

Beispiele

Beispiel 1

Herbizidbehandlung von *Arabidopsis thaliana* mit Flufenacet: Erzeugung des fiddlehead Phänotyps

Arabidopsis Samen (Ecotyp Columbia Col-0), die bei 4°C gelagert wurden, wurden auf Erde ausgesät und bei 22°C + 2°C im Langtag (16h Licht/8h Dunkel) kultiviert.

10 2 Wochen alte Pflanzen wurden mit 250 g/ha und 50 g/ha Flufenacet besprüht und bei 22°C + 2°C im Langtag (16h Licht/8h Dunkel) weiterkultiviert. Zwischen Tag 7 bis Tag 11 nach Flufenacet Behandlung verwachsen die Blütenorgane mit den obersten caulinen Blättern der Arabidopsis pflanzen. Diese Verwachsungen ähneln sehr stark denen der "fiddlehead" Mutanten. Ab Tag 18 sehen alle Blüten wieder normal aus, da Flufenacet durch die Glutathion S Transferase Aktivität der Pflanzen abgebaut wird.

Beispiel 2

Isolierung der beschriebenen Nukleotidsequenz FDH

20 Die Isolierung der beschriebenen Nukleotidsequenz FIDDLEHEAD (FDH) kann analog Lolle et al. 1992, Developmental Biology 152, 383-392, Yephremov et al. 1999, The Plant Cell 11, 2187-2201, Pruitt et al. 2000, PNAS 97(3), 1311-1316 oder gemäß WO 98/54954 (Klon EL 4) erfolgen. Unter Zuhilfenahme der unter SEQ ID NO: 1 beschriebenen Sequenz kann die Sequenz auch mit dem Fachmann bekannten Methoden ohne weiteres gewonnen werden.

Beispiel 3

Herstellung transgener *Arabidopsis* Pflanzen, die gegen VLCFAE gerichtete Wirkstoffe resistant sind

5 Ausgewählte, mutierte VLCFAE Genkonstrukte werden in geeignete pBIN Vektor-Konstrukte kloniert und auf geeignete Agrobakterienstämme übertragen. Die Vektorsequenzen tragen ein auf in Pflanzen selektionierbares Markergen, das z.B. die Resistenz gegen Kanamycin oder die Resistenz gegen das Herbizid BASTA vermittelt. *Arabidopsis*-Pflanzen werden angezogen und nach 4-6 Wochen, kurz vor der

10 Blüte in eine Suspension des mit dem Vektorkonstrukt transformierten Agrobakterienstammes getaucht. Der Kontakt des pflanzlichen Gewebes mit der Bakteriensuspension kann durch Vakuumfiltration verstärkt werden. Die so behandelten Pflanzen werden bis zu Samenreife weiterinkubiert. Die Samen werden geerntet und auf Selektionsmedium ausgelegt. Es überleben nur die Keimlinge, die das

15 übertragene Genkonstrukt und das Markergen enthalten, die also erfolgreich transformiert wurden. Eine detaillierte Beschreibung der Methode findet sich bei Bechthold N. und Pelletier G.: *In planta Agrobacterium mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration.* In: *Arabidopsis Protocols*, edited by Martinez-Zapater J.M. und Salina J., 1998 Humana Press ISBN 0-89603-

20 391-0.

Erläuterung der Abbildungen und des Sequenzprotokolls

Abb. 1: Phylogenetischer Baum von *Arabidopsis thaliana* beta-ketoacyl-CoA Synthasen mit Homologie zu FIDDLEHEAD (FDH) (DNA Star Programm MegAlign (Clustal Methode mit PAM250 „residue weight table“)).

5

SEQ ID NO: 1: Nukleinsäuresequenz kodierend für das Polypeptid "FIDDLEHEAD" (FDH) aus *Arabidopsis thaliana*, einer Very Long Chain Fatty Acid Elongase. Es handelt sich um eine genomische Sequenz, weshalb noch Introns enthalten sind. Die kodierenden Bereiche sind angegeben.

10

SEQ ID NO: 2: Aminosäuresequenz des Polypeptids "FIDDLEHEAD" (FDH) aus *Arabidopsis thaliana*.

15

Literatur

Abulnaja K.O. and Harwood J.L. 1991, Thiocarbamate Herbicides inhibit fatty acid elongation in a variety of monocotyledons. *Phytochemistry* 30(5), 1445-1447.

5

Altschul S.F., Madden T.L., SchafferA.A., Zhang J.Z.; Miller W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST und PSI-BLAST generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

10 Bechthold N. und Pelletier G. : *In planta Agrobacterium* mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* Plants by vacuum infiltration. In: *Arabidopsis Protocols*, edited by Bevan M. 1984. Binary Agrobacterium vectors for planttransformation. *Nucleic Acids Res* 12(22): 8711-8721.

15 Böger P., Matthes B. und Schmalfuß J. 2000, Towards the primary target of chloroacetamides - new findings pave the way. *Pest Managment Science* 56: 497-508.Lolle S. J., Cheung A.Y. and Sussex I.M. 1992, *Fiddlehead*: An *Arabidopsis* Mutant constitutively expressing an organ fusion program that involves interaction between epidermal cells. *Developmental Biology* 152, 383-392.

20 Lottspeich, F., Zorbas H. (Hrsg.). 1998. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.Martinez-Zapater J.M. und Salina J. , 1998 Humana Press ISBN 0-89603-391-0.

25 Matthes B., Schmalfuß J. and Boeger P. 1998, Chloracetamide Mode of Action II: Inhibition of Very Long Chain Fatty Acid Synthesis in Higher Plants. *Z. Naturforsch.* 53c, 1004-1011.

30 Millar A.A. and Kunst L. 1997, Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *The Plant Journal* 12(1), 121-131.

Millar A.A., Smith M.A., Kunst L. 2000, All fatty acids are not equal: discrimination in plant membrane lipids. Trends in Plant Science 5, 95-101.

5 Minet, M., Dufour, M.-E. and Lacroute, F. 1992. Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. Plant J. 2: 417-422.

10 Möllers C. und Albrecht S. 1994, Screening herbicide effects on lipid metabolism of storage lipids by *in vitro* culture of microspore-derived embryoids of *Brassica napus*. J. Plant Physiol. 144, 376-384.

15 Mumberg D., Müller R. und Funk M. 1995, Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds Gene 156, 119-122.

Pruitt R.E., Vielle-Calzada J-P., Ploense S.E., Grossniklaus U. and Lolle S.J. 2000, *FIDDLEHEAD*, a gene required to suppress epidermal cell interactions in *Arabidopsis*, encodes a putative lipid biosynthetic enzyme. PNAS 97(3), 1311-1316.

20 Puissant, C. und Houdebine, L.-M. 1990. An improvement of the single-step method of the RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. BioTechniques 8: 148-149.

25 Skoog, F., Miller, C.O. 1957. Chemical regeneration of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-131.

WO 2000/008172

30 WO 95/15387

WO 96/13 582

WO 98/46766

5 WO 98/54954

Yephremov A., Wismann E., Huijser P., Huijser C., WellesenK, Saedler H. 1999,
Characterization of the *FIDDLEHEAD* Gene of *Arabidopsis* reveals a link between
adhesion response and cell differentiation in the epidermis. *The Plant Cell* 11,
10 2187-2201.

Patentansprüche

1. Verwendung von Polypeptiden mit der biologischen Aktivität einer Very Long Chain Fatty Acid Elongase zum Identifizieren von herbizid wirksamen Verbindungen.
5
2. Verwendung von Polypeptiden mit der biologischen Aktivität einer Very Long Chain Fatty Acid Elongase gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Polypeptide handelt, die dem Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 2 zu 60% homolog sind.
10
3. Verwendung von Polypeptiden mit der biologischen Aktivität einer Very Long Chain Fatty Acid Elongase gemäß Anspruch 1 zum Identifizieren von herbizid wirksamen Verbindungen, dadurch gekennzeichnet, dass die herbizid wirksamen Substanzen Modulatoren dieser Polypeptide sind.
15
4. Verwendung von Polypeptiden mit der biologischen Aktivität einer Very Long Chain Fatty Acid Elongase gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Polypeptide eine Sequenz umfassen, die ausgewählt ist aus
20
 - a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2,
 - b) Sequenzen, die von einer Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO: 1 kodiert werden,
25
 - c) Teilsequenzen der unter a) oder b) definierten Sequenzen, die noch die biologische Aktivität einer VLCFAE besitzen,

- d) Sequenzen, welche eine zumindest 60 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität mit den unter a) bis c) definierten Sequenzen aufweisen,
- 5 e) Sequenzen, die das C-terminal lokalisierte aktive Zentrum des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 2 umfassen,
- f) Sequenzen, welche eine zumindest 60 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität mit den unter e) definierten Sequenzen aufweisen,
- 10 g) Sequenzen, die den spezifischen N-Terminus des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 2 umfassen,
- h) Sequenzen, welche eine zumindest 60 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität mit den unter g) definierten Sequenzen aufweisen.

15 5. Verwendung von Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit der biologischen Aktivität einer Very Long Chain Fatty Acid Elongase kodieren, in Verfahren zum Identifizieren von Modulatoren dieser Polypeptide.

20 6. Verwendung von Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit der biologischen Aktivität einer Very Long Chain Fatty Acid Elongase kodieren, zum Identifizieren von Substanzen, welche die Expression der von ihnen kodierten Polypeptide verändern.

25 7. Verwendung von Nukleinsäuren gemäß Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einzelsträngige oder doppelsträngige DNA oder RNA handelt.

30

8. Verwendung von Nukleinsäuren gemäß Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Fragmente genomischer DNA oder um cDNA handelt.

5 9. Verwendung von Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuren eine Sequenz umfassen, die ausgewählt ist aus

10 a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,

15 b) Sequenzen, die für ein Polypeptid codieren, welches die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst,

15 c) zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter a) oder b) definierten Sequenzen,

20 d) Sequenzen, welche an die unter a) oder b) definierten Sequenzen hybridisieren,

20 e) Sequenzen, welche eine zumindest 60 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität mit den unter a) oder b) definierten Sequenzen aufweisen,

25 f) Sequenzen, welche für das C-terminal lokalisierte aktive Zentrum des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 2 kodieren,

25 g) Sequenzen, welche eine zumindest 60 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität mit den unter f) definierten Sequenzen aufweisen,

h) Sequenzen, welche für den spezifischen N-Terminus des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 2 kodieren,

5 i) Sequenzen, welche eine zumindest 60 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige Identität mit den unter h) definierten Sequenzen aufweisen,

10 j) Sequenzen, welche zu den unter a) bis h) definierten Sequenzen komplementär sind, und

k) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren wie die unter a) bis h) definierten Sequenzen.

15 10. Verwendung der regulatorischen Region, welche natürlicherweise die Transkription einer Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO: 1 in Pflanzenzellen, insbesondere in Arabidopsis, kontrolliert, in Verfahren zum Identifizieren von herbizid wirksamen Verbindungen.

20 11. Verwendung eines DNA-Konstrukts umfassend eine Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO: 1 und eines heterologen Promotors in Verfahren zum Identifizieren von herbizid wirksamen Verbindungen.

25 12. Verwendung eines Vektors umfassend eine Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO:1, eine regulatorische Region gemäß Anspruch 7 oder ein DNA-Konstrukt gemäß Anspruch 8 in Verfahren zum Identifizieren von herbizid wirksamen Verbindungen.

30 13. Verwendung einer Wirtszelle enthaltend eine Nukleinsäure kodierend für ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 2 in Verfahren zum Identifizieren von herbizid wirksamen Verbindungen.

14. Verwendung einer Wirtszelle gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um *E. coli*, handelt.

5 15. Verwendung einer Wirtszelle gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Hefe-, Insekten-, Säugetier oder Pflanzenzelle, handelt.

10 16. Verfahren zum Auffinden einer chemischen Verbindung, die an ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität eine Very Long Chain Fatty Acid Elongase, umfassend die folgenden Schritte:

15 (a) Inkontaktbringen eines Polypeptids mit der biologischen Aktivität einer Very Long Chain Fatty Acid Elongase oder einer Wirtszelle enthaltend ein Polypeptid mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen unter Bedingungen, die die Interaktion einer chemischen Verbindung mit dem Polypeptid erlauben, und

20 (b) Bestimmen der chemischen Verbindung, die spezifisch an das Polypeptid bindet.

25 17. Verfahren zum Auffinden einer Verbindung, welche die Expression von Polypeptiden mit der biologischen Aktivität einer Very Long Chain Fatty Acid Elongase verändert, umfassend die folgenden Schritte:

30 (a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle enthaltend ein für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Very Long Chain Fatty Acid Elongase kodierenden Nukleinsäure mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen,

 (b) Bestimmen der Polypeptidkonzentration, und

(c) Bestimmen der Verbindung, welche die Expression des Polypeptids spezifisch beeinflusst.

18. Verwendung eines Modulators eines Polypeptids mit der biologischen Aktivität einer Very Long Chain Fatty Acid Elongase als Pflanzenwuchsregulator oder Herbizid.

5 19. Modulatoren von VLCFAE, die mittels eines Verfahrens gemäß Anspruch 16 oder 17 gefunden werden.

10 20. Herbizid wirksame Substanzen, die mittels eines Verfahrens gemäß Anspruch 16 oder 17 gefunden werden.

15 21. Verwendung der für ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 2 kodierenden Nukleinsäure zum Herstellen von transgenen Pflanzen.

20 21. Transgene Pflanzen, Pflanzenteile, Protoplasten, Pflanzengewebe oder Pflanzenvermehrungsmaterialien, dadurch gekennzeichnet, dass nach Einbringen einer für ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 2 kodierenden Nukleinsäure die intrazelluläre Konzentration eines Polypeptids gemäß Anspruch 14 im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Zellen erhöht oder vermindert ist.

25 22. Pflanzen, Pflanzenteile, Protoplasten, Pflanzengewebe oder Pflanzenvermehrungsmaterialien, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 2 enthalten, dessen biologische Aktivität oder Expressionsmuster im Vergleich zu den entsprechenden endogenen Polypeptiden verändert ist.

Verwendung von VLCFAE zum Identifizieren von herbizid wirksamen Verbindungen

5

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuren, die für pflanzliche Polypeptide mit der biologischen Aktivität von Very Long Chain Fatty Acid Elongasen kodieren und die Verwendung der davon kodierten Polypeptide zum Identifizieren von neuen, herbizid wirksamen Verbindungen, sowie Verfahren zum Auffinden von Modulatoren dieser Polypeptide.

10

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BAYER AG

<120> Verwendung von VLCFAE zum Identifizieren von herbizid wirksamen Verbindungen

<130> Le A 34 730

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2782

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (176) .. (583)

<220>

<221> CDS

<222> (1119) .. (1745)

<220>

<221> CDS

<222> (1821) .. (2438)

<400> 1

acattaacta cctctcacca accaccaaac ccaatccca caatattacc attactctca 60

tataactaca catattcata tttacatttt ttgccaaacac aactccttat aagatataca
120

cttcatcaac ctatagatct cactcacata atcaacctac aaaacaaaaa caaga atg
178

Met
1

ggg aga tcc aac gag caa gat ctg ctc tct acc gag atc gtt aat cgt
226

Gly Arg Ser Asn Glu Gln Asp Leu Leu Ser Thr Glu Ile Val Asn Arg
5 10 15

ggg atc gaa cca tcc ggt cct aac gcc ggc tca cca acg ttc tcg gtt
274

Gly Ile Glu Pro Ser Gly Pro Asn Ala Gly Ser Pro Thr Phe Ser Val
20 25 30

agg gtc agg aga cgt ttg cct gat ttt ctt cag tcg gtg aac ttg aag
322

Arg Val Arg Arg Arg Leu Pro Asp Phe Leu Gln Ser Val Asn Leu Lys
35 40 45

Le A 34 730

- 2 -

tac gtg aaa ctt ggt tac cac tac ctc ata aac cat gcg gtt tat ttg
370
Tyr Val Lys Leu Gly Tyr His Tyr Leu Ile Asn His Ala Val Tyr Leu
50 55 60 65

gcg acc ata ccg gtt ctt gtg ctg gtt ttt agt gct gag gtt ggg agt
418
Ala Thr Ile Pro Val Leu Val Leu Val Phe Ser Ala Glu Val Gly Ser
70 75 80

tta agc aga gaa gag att tgg aag aag ctt tgg gac tat gat ctt gca
466
Leu Ser Arg Glu Glu Ile Trp Lys Lys Leu Trp Asp Tyr Asp Leu Ala
85 90 95

act gtt atc gga ttc ttc ggt gtc ttt gtt tta acc gct tgt gtc tac
514
Thr Val Ile Gly Phe Phe Gly Val Phe Val Leu Thr Ala Cys Val Tyr
100 105 110

ttc atg tct cgt cct cgc tct gtt tat ctt att gat ttc gct tgt tac
562
Phe Met Ser Arg Pro Arg Ser Val Tyr Leu Ile Asp Phe Ala Cys Tyr
115 120 125

aag ccc tcc gat gaa cac aag gtacgtccca actttccat agaggaaata
613
Lys Pro Ser Asp Glu His Lys
130 135

gtctaaatta cttttaccca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa atctaaatta agtataactta
673

agaaattata attagatttg tcaaaaaata ataattataa ttagatggat tagttgtta
733

tagggctgcc taaataaaaat aaaattttgc ctttgcattgt gttacgttag taattatttt
793

tcaggtatat ataaaaagta attattttgc aaaacctta gatattggtt acgtttgatt
853

taaaaccgaa tggttcgta gaaatttgag aaagtagata acctaaaaac tccgattaaa
913

gaaaccggtt tgacttatat aattttaact gtttctgtt ttcattttat tttataaaaa
973

aaacaatcca aatttacgac ctataatcaa aggagattga taggaaccgg actgataatt
1033

aatgaagct gaatcaaacc aaacaaaagt tcatttaatt ccgggtctct cgggttaat
1093

ctcttttgc attggattgg tttag gtg aca aaa gaa gag ttc ata gaa cta
1145
Val Thr Lys Glu Glu Phe Ile Glu Leu
140 145

gcg aga aaa tca ggg aag ttc gac gaa gag aca ctc ggt ttc aag aag
1193
Ala Arg Lys Ser Gly Lys Phe Asp Glu Glu Thr Leu Gly Phe Lys Lys
150 155 160

agg atc tta caa gcc tca ggc ata ggc gac gag aca tac gtc cca aga
 1241
 Arg Ile Leu Gln Ala Ser Gly Ile Gly Asp Glu Thr Tyr Val Pro Arg
 165 170 175

 tcc atc tct tca tca gaa aac ata aca acg atg aaa gaa ggt cgt gaa
 1289
 Ser Ile Ser Ser Ser Glu Asn Ile Thr Thr Met Lys Glu Gly Arg Glu
 180 185 190

 gaa gcc tct aca gtg atc ttt gga gca cta gac gaa ctc ttc gag aag
 1337
 Glu Ala Ser Thr Val Ile Phe Gly Ala Leu Asp Glu Leu Phe Glu Lys
 195 200 205

 aca cgt gta aaa cct aaa gac gtt ggt gtc ctt gtg gtt aac tgt agc
 1385
 Thr Arg Val Lys Pro Lys Asp Val Gly Val Leu Val Val Asn Cys Ser
 210 215 220 225

 att ttc aac ccg aca ccg tcg ttg tcc gca atg gtg ata aac cat tac
 1433
 Ile Phe Asn Pro Thr Pro Ser Leu Ser Ala Met Val Ile Asn His Tyr
 230 235 240

 aag atg aga ggg aac ata ctt agt tac aac ctt gga ggg atg gga tgt
 1481
 Lys Met Arg Gly Asn Ile Leu Ser Tyr Asn Leu Gly Gly Met Gly Cys
 245 250 255

 tcg gct gga atc ata gct att gat ctt gct cgt gac atg ctt cag tct
 1529
 Ser Ala Gly Ile Ile Ala Ile Asp Leu Ala Arg Asp Met Leu Gln Ser
 260 265 270

 aac cct aat agt tat gct gtt gtg agt act gag atg gtt ggg tat
 1577
 Asn Pro Asn Ser Tyr Ala Val Val Val Ser Thr Glu Met Val Gly Tyr
 275 280 285

 aat tgg tac gtg gga agt gac aag tca atg gtt ata cct aat tgt ttc
 1625
 Asn Trp Tyr Val Gly Ser Asp Lys Ser Met Val Ile Pro Asn Cys Phe
 290 295 300 305

 ttt agg atg ggt tgt tct gcc gtt atg ctc tct aac cgt cgt cgt gag
 1673
 Phe Arg Met Gly Cys Ser Ala Val Met Leu Ser Asn Arg Arg Arg Asp
 310 315 320

 ttt cgc cat gct aag tac cgt ctc gag cac att gtc cga act cat aag
 1721
 Phe Arg His Ala Lys Tyr Arg Leu Glu His Ile Val Arg Thr His Lys
 325 330 335

 gct gct gac gac cgt agc ttc agg tttcattcat tttggattta attcgttta
 1775
 Ala Ala Asp Asp Arg Ser Phe Arg
 340 345

 caatcttttg accgaccttag taactaattt tttgtggttt tttagg agt gtg tac cag
 1832

Ser Val Tyr Gln

gaa gaa gat gaa caa gga ttc aag ggg ttg aag ata agt aga gac tta
 1880
 Glu Glu Asp Glu Gln Gly Phe Lys Gly Leu Lys Ile Ser Arg Asp Leu
 350 355 360 365
 atg gaa gtt gga ggt gaa gct ctc aag aca aac atc act acc tta ggt
 1928
 Met Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Lys Thr Asn Ile Thr Thr Leu Gly
 370 375 380
 cct ctt gtc cta cct ttc tcc gag cag ctt ctc ttc ttt gct gct ttg
 1976
 Pro Leu Val Leu Pro Phe Ser Glu Gln Leu Leu Phe Phe Ala Ala Leu
 385 390 395
 ctc cgc cga aca ttc tca cct gct gcc aaa acg tcc aca acc act tcc
 2024
 Leu Arg Arg Thr Phe Ser Pro Ala Ala Lys Thr Ser Thr Thr Ser
 400 405 410
 ttc tct act tcc gcc acc gca aaa acc aat gga atc aag tct tcc tct
 2072
 Phe Ser Thr Ser Ala Thr Ala Lys Thr Asn Gly Ile Lys Ser Ser Ser
 415 420 425
 tcc gat ctg tcc aag cca tac atc ccg gac tac aag ctc gcc ttc gag
 2120
 Ser Asp Leu Ser Lys Pro Tyr Ile Pro Asp Tyr Lys Leu Ala Phe Glu
 430 435 440 445
 cat ttt tgc ttc cac gcg gca agc aaa gta gtg ctt gaa gag ctt caa
 2168
 His Phe Cys Phe His Ala Ala Ser Lys Val Val Leu Glu Glu Leu Gln
 450 455 460
 aag aat cta ggc ttg agt gaa gag aat atg gag gct tct agg atg aca
 2216
 Lys Asn Leu Gly Leu Ser Glu Glu Asn Met Glu Ala Ser Arg Met Thr
 465 470 475
 ctt cac agg ttt gga aac act tct agc agt gga atc tgg tat gag ttg
 2264
 Leu His Arg Phe Gly Asn Thr Ser Ser Ser Gly Ile Trp Tyr Glu Leu
 480 485 490
 gct tac atg gag gcc aag gaa agt gtt cgt aga ggc gat agg gtt tgg
 2312
 Ala Tyr Met Glu Ala Lys Glu Ser Val Arg Arg Gly Asp Arg Val Trp
 495 500 505
 cag atc gct ttc ggt tct ggt ttt aag tgt aac agt gtg gtg tgg aag
 2360
 Gln Ile Ala Phe Gly Ser Gly Phe Lys Cys Asn Ser Val Val Trp Lys
 510 515 520 525
 gca atg agg aag gtg aag aag cca acc agg aac aat cct tgg gtg gat
 2408
 Ala Met Arg Lys Val Lys Lys Pro Thr Arg Asn Asn Pro Trp Val Asp
 530 535 540

tgc atc aac cgt tac cct gtg cct ctc taa attatcatc ttctaaatta
2458
Cys Ile Asn Arg Tyr Pro Val Pro Leu
545 550

aatcaagtaa gatctctaattactccaacc aaaagataca gtttggttgg atgataggag
2518

ttatTTactg atcattcgta tctaagtctg ttataagaat ggatgtggct agagtcctgt
2578

tcagctcaa ctTgttttat ttTTgtttg ttctctattg gatcttcata aactttgaga
2638

gattaaagaa aaaaactctt cttagtttg atagaacaga tggcattgt aatttcttta
2698

atatgtcaaa gtaaaacaat ttcttttaa ggcaatctat attcagatac ataataaatt
2758

tagttacgt gtataagaag atac
2782

<210> 2
<211> 550
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2
Met Gly Arg Ser Asn Glu Gln Asp Leu Leu Ser Thr Glu Ile Val Asn
1 5 10 15

Arg Gly Ile Glu Pro Ser Gly Pro Asn Ala Gly Ser Pro Thr Phe Ser
20 25 30

Val Arg Val Arg Arg Arg Leu Pro Asp Phe Leu Gln Ser Val Asn Leu
35 40 45

Lys Tyr Val Lys Leu Gly Tyr His Tyr Leu Ile Asn His Ala Val Tyr
50 55 60

Leu Ala Thr Ile Pro Val Leu Val Leu Val Phe Ser Ala Glu Val Gly
65 70 75 80

Ser Leu Ser Arg Glu Glu Ile Trp Lys Lys Leu Trp Asp Tyr Asp Leu
85 90 95

Ala Thr Val Ile Gly Phe Phe Gly Val Phe Val Leu Thr Ala Cys Val
100 105 110

Tyr Phe Met Ser Arg Pro Arg Ser Val Tyr Leu Ile Asp Phe Ala Cys
115 120 125

Tyr Lys Pro Ser Asp Glu His Lys Val Thr Lys Glu Glu Phe Ile Glu
130 135 140

Leu Ala Arg Lys Ser Gly Lys Phe Asp Glu Glu Thr Leu Gly Phe Lys
145 150 155 160

Lys Arg Ile Leu Gln Ala Ser Gly Ile Gly Asp Glu Thr Tyr Val Pro
165 170 175

Arg Ser Ile Ser Ser Ser Glu Asn Ile Thr Thr Met Lys Glu Gly Arg
180 185 190

Glu Glu Ala Ser Thr Val Ile Phe Gly Ala Leu Asp Glu Leu Phe Glu
195 200 205

Lys Thr Arg Val Lys Pro Lys Asp Val Gly Val Leu Val Val Asn Cys
210 215 220

Ser Ile Phe Asn Pro Thr Pro Ser Leu Ser Ala Met Val Ile Asn His
225 230 235 240

Tyr Lys Met Arg Gly Asn Ile Leu Ser Tyr Asn Leu Gly Gly Met Gly
245 250 255

Cys Ser Ala Gly Ile Ile Ala Ile Asp Leu Ala Arg Asp Met Leu Gln
260 265 270

Ser Asn Pro Asn Ser Tyr Ala Val Val Val Ser Thr Glu Met Val Gly
275 280 285

Tyr Asn Trp Tyr Val Gly Ser Asp Lys Ser Met Val Ile Pro Asn Cys
290 295 300

Phe Phe Arg Met Gly Cys Ser Ala Val Met Leu Ser Asn Arg Arg Arg
305 310 315 320

Asp Phe Arg His Ala Lys Tyr Arg Leu Glu His Ile Val Arg Thr His
325 330 335

Lys Ala Ala Asp Asp Arg Ser Phe Arg Ser Val Tyr Gln Glu Glu Asp
340 345 350

Glu Gln Gly Phe Lys Gly Leu Lys Ile Ser Arg Asp Leu Met Glu Val
355 360 365

Gly Gly Glu Ala Leu Lys Thr Asn Ile Thr Thr Leu Gly Pro Leu Val
370 375 380

Leu Pro Phe Ser Glu Gln Leu Leu Phe Phe Ala Ala Leu Leu Arg Arg
385 390 395 400

Thr Phe Ser Pro Ala Ala Lys Thr Ser Thr Thr Ser Phe Ser Thr
405 410 415

Ser Ala Thr Ala Lys Thr Asn Gly Ile Lys Ser Ser Ser Asp Leu
420 425 430

Ser Lys Pro Tyr Ile Pro Asp Tyr Lys Leu Ala Phe Glu His Phe Cys
435 440 445

Phe His Ala Ala Ser Lys Val Val Leu Glu Leu Gln Lys Asn Leu
450 455 460

Gly Leu Ser Glu Glu Asn Met Glu Ala Ser Arg Met Thr Leu His Arg
465 470 475 480

Phe Gly Asn Thr Ser Ser Ser Gly Ile Trp Tyr Glu Leu Ala Tyr Met
485 490 495

Glu Ala Lys Glu Ser Val Arg Arg Gly Asp Arg Val Trp Gln Ile Ala
500 505 510

Phe Gly Ser Gly Phe Lys Cys Asn Ser Val Val Trp Lys Ala Met Arg
515 520 525

Lys Val Lys Lys Pro Thr Arg Asn Asn Pro Trp Val Asp Cys Ile Asn
530 535 540

Arg Tyr Pro Val Pro Leu
545 550

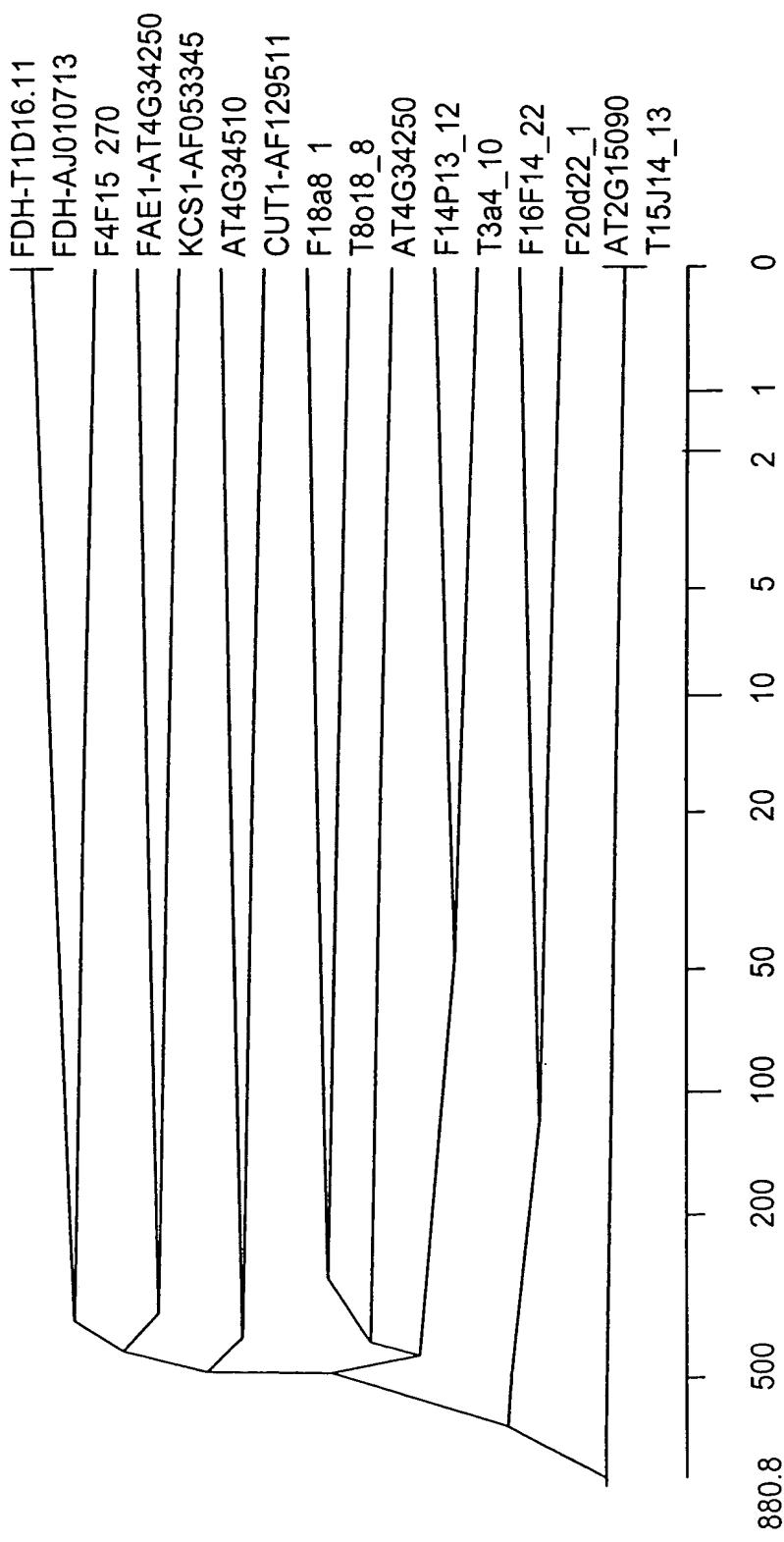


Abbildung 1